

10/539805

JC05 Rec'd PCT/PTO 0 JUN 2005

DOCKET NO.: 274011US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hironori TASHIRO, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/15992

INTERNATIONAL FILING DATE: December 12, 2003

FOR: METHOD OF MEASURING BIODEGRADATION RATE OF UNNATURAL ORGANIC COMPOUND

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NO</u> | <u>DAY/MONTH/YEAR</u> |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Japan | 2002-366721 | 18 December 2002 |

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/15992. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

12.12.03

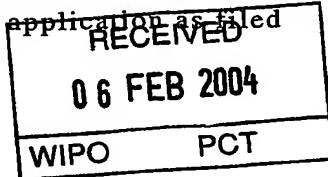
#2

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2002年12月18日



出願番号 Application Number: 特願 2002-366721
[ST. 10/C]: [JP 2002-366721]

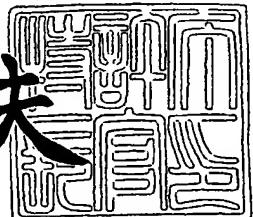
出願人 Applicant(s): 出光石油化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 IP11402
【提出日】 平成14年12月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 27/00
【発明の名称】 非天然系有機化合物の生分解率の測定方法
【請求項の数】 3
【発明者】
【住所又は居所】 山口県徳山市新宮町1番1号
【氏名】 田代 裕統
【発明者】
【住所又は居所】 山口県徳山市新宮町1番1号
【氏名】 伊藤 真治
【特許出願人】
【識別番号】 000183657
【氏名又は名称】 出光石油化学株式会社
【代理人】
【識別番号】 100078732
【弁理士】
【氏名又は名称】 大谷 保
【選任した代理人】
【識別番号】 100081765
【弁理士】
【氏名又は名称】 東平 正道
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 003171
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0000936

【包括委任状番号】 0000758

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 非天然系有機化合物の生分解率の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体¹⁴Cの濃度を測定し、該¹⁴C濃度と現代炭素における¹⁴C濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする、非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

【請求項2】 内部標準を用いて生分解率を測定することを特徴とする、請求項1に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

【請求項3】 内部標準が、鉄、銅、およびマンガン等の生体必須金属からなる群から選ばれる金属であることを特徴とする、請求項2に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、非天然系有機化合物の生分解率の測定方法に関する。さらに詳しくは、非天然系有機化合物の生分解率を、放射性炭素同位体¹⁴Cの現代炭素からの変化を利用して、安全で簡便かつ迅速に、しかも精度よく測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

有機化合物の生分解率を直接測定するためには、先ず、試料中に放射性炭素同位体¹⁴Cを有機化学的に富化する必要がある。つぎに、この放射性炭素同位体¹⁴Cを富化した試料を生分解させ、その生分解に伴って生成する二酸化炭素の放射線量をシンチレーションカウンターによって測定することにより、その有機化合物の生分解によって生成した二酸化炭素中の放射性炭素同位体¹⁴Cの絶対量を求め、使用した放射性炭素同位体¹⁴C富化試料中の該¹⁴Cの絶対量との比をとることによって、有機化合物の生分解率を測定する方法である。

【0003】

ところが、この測定方法においては、放射性の¹⁴Cを使用するために、一連の測定操作のすべてを放射線対策の施された空間において実施する必要があり、生分解に伴って生成する二酸化炭素の放射線量の測定に長時間を要するほか、このために放射線量の測定時にバックグラウンド放射能などの外乱による誤差が生じやすいという問題があった。

そこで、このような非天然系有機化合物の生分解率を測定するに際して、測定試料を高価な放射性炭素同位体¹⁴Cで富化することなく、また特別な放射線対策を施す必要がなく、さらに迅速かつ高い精度で、その生分解率を測定することができる方法の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、非天然系有機化合物の生分解率を、特別な放射線対策を施すことなく安全で簡便かつ迅速に、しかも測定誤差が少なく精度よく測定することができる方法を提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、非天然系有機化合物中には崩壊性の放射性炭素同位体¹⁴Cは崩壊しきって残存していないことを利用し、生分解を行なう際の測定試料を混合した培地からの二酸化炭素中の該¹⁴C濃度を測定し、該¹⁴C濃度と現代炭素の¹⁴C濃度との差異を測定することより、非天然系有機化合物の生分解率が測定できることを見出した。さらに、生分解培地中に含まれている金属を内部標準として利用することにより、従来は不可能であった開放されたフィールドでの生分解率の測定ができるを見出し、これら知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明の要旨は、下記のとおりである。

(1) 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体¹⁴Cの濃度を測定し、該¹⁴C濃度と現代炭素における¹⁴C濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする

る非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

(2) 内部標準を用いて生分解率を測定することを特徴とする、前記(1)に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

(3) 内部標準が、鉄、銅、およびマンガン等の生体必須金属からなる群から選ばれる金属であることを特徴とする、前記(2)に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法は、非天然系有機化合物の生分解培地存在下での生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体¹⁴Cの濃度を測定し、該¹⁴C濃度と現代炭素における¹⁴C濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする非天然系有機化合物の生分解率の測定方法である。

【0008】

本発明において生分解率の測定に利用される非天然系有機化合物とは、例えば、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料を原料として合成された様々な石油化学製品や石炭化学製品などの各種の有機化合物である。これら非天然系有機化合物の中でも、例えば、合成洗剤などのように使用後に排水と共に自然界に流出して河川や湖沼の水質を汚染するなど、自然環境に悪影響を及ぼすおそれの大きい物質については、特にその自然界での微生物による生分解の進行の状況を調べる必要性の高い物質である。

【0009】

ここで、天然系の炭素含有物質、例えば大気中の二酸化炭素や植物体においては、1モルの炭素は 6.0×10^{23} 個であるが、炭素中の¹⁴C濃度は、¹²Cに対する¹⁴Cの存在比が 10^{12} 分の1であることから、放射性炭素同位体¹⁴Cは 6×10^{11} 個である。そして、この放射性炭素同位体¹⁴Cの半減期は、5,730±40年であることから、これら 6×10^{11} 個の放射性炭素同位体¹⁴Cがすべて崩壊するまでの期間としては、22.6万年が必要である。したがって、大気中の二酸化炭素を植物などの生物体内に取り込んで固定化した後

、地中で22.6万年以上経過した石炭や天然ガス、石油などの化石燃料においては、これらの中に含まれていた炭素中の放射性炭素同位体¹⁴Cはそのすべてがすでに崩壊していることとなる。

【0010】

そして、本発明においては、このようにすでに崩壊して放射性炭素同位体¹⁴Cを含有しない化石燃料を原料として合成された石油化学製品や石炭化学製品などの各種の非天然系有機化合物について、微生物などによる生分解率を測定し、その結果より、これら物質の自然界における生分解過程を追跡することができるようとするものである。

【0011】

ここで、¹⁴C濃度の表記法として、国際的な決めにより1950年時点の循環炭素中の¹⁴C濃度を100%として計算される値があり、これをpMC (percent Modern Carbon)と呼ぶ。1950年以降、大気中の二酸化炭素の中の放射性炭素同位体¹⁴Cの濃度は変動しており、現代(2002年)の炭素における¹⁴C濃度は110~111%の範囲内にある。

【0012】

つぎに、本発明の方法を実施するにあたっては、例えば、第1図に示すように構成された生分解反応装置を用いて、化石燃料を原料として合成された石油化学製品などの非天然系有機化合物である生分解率を測定するための試料と、放射性炭素同位体¹⁴Cを含有する天然物であって試料の非天然系有機化合物の生分解を生じさせる作用を持つ物質、例えば、堆肥や活性汚泥、土壤懸濁液などを混合して反応槽1に入れ、この反応槽1内の底部近傍に、大気中の二酸化炭素を完全に除去した空気を導入しながら、所定の温度において、試料の生分解反応を実施する。

【0013】

そして、この反応槽1に供給する空気は、第1図に示すように水酸化ナトリウム水溶液などを入れた二酸化炭素吸収槽2と、水洗槽3を経由して、反応槽1に導入することによって、大気中の二酸化炭素が反応系内に入り込まないようにする。また、この反応槽1に導入された空気は、生分解反応において消費された一

部を除き、生分解反応で生成した二酸化炭素と共に反応槽1の頂部近傍より、貯留槽4、第1段トラップ5、第2段トラップ6に導入される。

【0014】

このようにして、生分解反応を所定期間、例えば10日間実施した後、生分解した試料の非天然系有機化合物を含む培地を、同様に二酸化炭素を除いた空气中、または純酸素中で燃焼してこれを二酸化炭素に変換し、この二酸化炭素を同様にして水酸化ナトリウム水溶液などを通して吸収させて捕捉する。その後、シンチレーションカウンターあるいは加速器質量分析計を用いて二酸化炭素中の放射性炭素同位体¹⁴Cの含有率(pMC)を測定することができる。

【0015】

測定する試料の生分解率は、上記のようにして求めた試料を含む培地の生分解前と生分解後のpMCと、試料の非天然系有機化合物を全く添加することなく、肥料などの天然物のみからなる培地を使用して、同様に処理して求めた放射性炭素同位体¹⁴Cの含有率(対照培地のpMC)の値を求めて、これらの値を使用して、以下のような計算式によって求めることができる。

生分解培地中の¹⁴C濃度からの排出炭酸ガス量基準の算出法：

【0016】

【数1】

$$B = \frac{(\text{分解前対照培地のpMC}) - (\text{分解前試料培地のpMC})}{(\text{分解前対照培地のpMC})} \quad (1)$$

【0017】

【数2】

$$C = \frac{(\text{分解後対照培地のpMC}) - (\text{分解後試料培地のpMC})}{(\text{分解後対照培地のpMC})} \quad (2)$$

ただし、対照培地のpMCは、分解前と分解後とでその値は変化しない。

【0018】

【数3】

分解前の試料培地の炭素量（D）

$$D = \frac{\text{試料由来の炭素量 (g)}}{B} \quad (3)$$

【0019】

【数4】

分解後の試料培地の炭素量（E）

$$E = D - \frac{\text{試料培地の排出二酸化炭素量 (g)}}{44} \times \frac{12}{44} \quad (4)$$

【0020】

【数5】

$$\text{生分解率 (\%)} = \left[1 - \frac{E \times C}{D \times B} \right] \times 100 \quad (5)$$

$$= \left[1 - \frac{E \times C}{\text{試料由来の炭素量 (g)}} \right] \times 100 \quad (6)$$

【0021】

また、本発明の方法においては、前記の生分解を行なう培地の中に鉄、銅、マングンなどの金属種が含まれており、これらの金属種は生分解操作を行っても生分解されず、揮発等も起こらないので、これらの金属種の総量は生分解操作の前後においてほとんど変化しない。したがって、この性質を利用して生分解培地中の金属種を内部標準として使用して、次の計算式によても生分解率を求めることができる。

【0022】

【数6】

$$H = \frac{F}{G} \times D \quad (7)$$

【0023】

【数7】

$$E = \frac{J}{I} \times K = \frac{J}{I} \times \frac{F}{G} \times D \quad (8)$$

【0024】

上記の計算式における各記号の意味は以下のとおりである。

F : 分解前対照培地の金属濃度

G : 分解前対照培地の炭素濃度

I : 分解後対照培地の金属濃度

J : 分解後対照培地の炭素濃度

D : 分解前対照培地の炭素量 (g)

E : 分解後対照培地の炭素量 (g)

H : 分解前対照培地の金属量 (g)

K : 分解後対照培地の金属量 (g)

なお、金属を内部標準として用い、K=Hとする。

【0025】

この方法による場合には、前述のような生分解で発生する二酸化炭素を捕集する必要がないため、密閉した反応層の中で生分解を行なう必要がなく、大気中に開放された装置で測定することができるという利点がある。

【0026】

【実施例】

つぎに、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例1】

生分解反応装置として、第1図にその概略を示す装置を用い、堆肥中における

ポリカプロラクトンの生分解試験を行なった。

天然物として含水率6.5質量%の堆肥171.4g、含水率2.0質量%の水洗した海砂(25~35メッシュ)400.0g、および非天然系有機化合物としてポリカプロラクトン(以下、「PCL」と記載する)5.0gをよく混ぜ合わせて生分解培地を作成し、分析用に全体の4質量%をサンプリングし、残りを反応槽1に充填した。

【0027】

ついで、この反応槽1を58℃の恒温槽に装入し、低圧の空気を、二酸化炭素吸收槽2と水洗槽3を通して大気中の二酸化炭素を除去してから、反応槽1の底部近傍まで差し込んだ空気導入管より導入した。二酸化炭素吸收槽2には、2規定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を入れて大気中の二酸化炭素を吸収させた。また、空気の通気量は、30ミリリットル/分とした。また、反応槽1の頂部近傍から余剰の空気および反応槽1内での生分解反応により生成した二酸化炭素を導管により貯留槽4に導入し、貯留槽4の出口からの導管を第1段トラップ5の水酸化ナトリウム水溶液中に導入した。この第1段トラップ5の下流側に第2段トラップ6を設けて、余剰空気のみを大気に放出した。

【0028】

このようにして11日間にわたり、PCLを堆肥中において生分解させた。この生分解後の培地を、燃焼炉において上記の生分解反応装置と同様の二酸化炭素吸收槽を通して二酸化炭素を除去した空気を用いて燃焼し、燃焼ガスを水酸化ナトリウム水溶液を入れたトラップで捕捉し、この水溶液中の二酸化炭素の量及びそのpMC値を求めた。

同様に、生分解前に採取した培地のサンプルについても、燃焼炉において燃焼し、二酸化炭素のpMC値を求めた。また、生分解前に採取した培地と、生分解後の培地について、その中の鉄分(Fe)濃度と全炭素濃度を測定した。

また、比較例として、上記の生分解反応装置と同じ構成の生分解反応装置を用いて、この装置の反応槽1に、非天然系有機化合物であるPCLを加えない他は、上記の生分解反応と同一の条件下に、11日間の堆肥のみの生分解反応を行った。この場合も生分解前に採取した培地のサンプルと、生分解後の培地について

、実施例1と同様にして二酸化炭素の量及びpMC値を求めた。
これらの結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

表1

| | 実施例 | 比較例 |
|------------------|--------|--------|
| 分解前培地のpMC (%) | 105.19 | 115.82 |
| 分解後培地のpMC (%) | 113.01 | * |
| 分解前培地のFe濃度 (ppm) | 50 | - |
| 分解後培地のFe濃度 (ppm) | 66 | - |
| 分解前培地の炭素濃度 (%) | 6.87 | - |
| 分解後培地の炭素濃度 (%) | 5.22 | - |

* : 分解前と変化なし

【0030】

これらの結果を用いて、前記式(1)～式(6)を用いて、培地からの排出二酸化炭素量を基準とした場合の生分解率をもとめ、前記式(7)、(8)から内部標準基準の場合の生分解率を求めた。これらの結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

表2

| 算出法 | 生分解率 (%) |
|-----------------------|----------|
| 排出CO ₂ 量基準 | 77 |
| 内部標準基準 | 80 |

【0032】

【発明の効果】

本発明によれば、非天然系有機化合物の生分解率を安全で簡便かつ迅速に、し

かも精度よく測定することのでき、また、内部標準を利用した方法の場合には、更に大気中に開放された装置で測定することができるという効果も有する非天然系有機化合物の生分解率の測定方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施に用いる生分解反応装置の一例の説明図である。

【符号の説明】

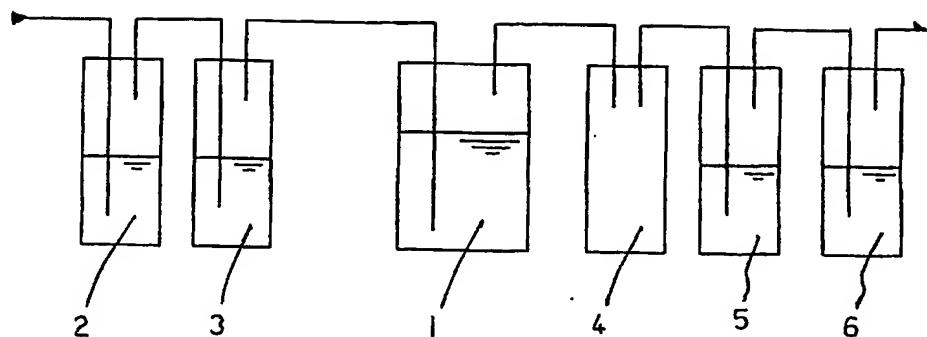
- 1 反応槽
- 2 二酸化炭素吸収槽
- 3 水洗槽
- 4 貯留槽
- 5 第1段トラップ
- 6 第2段トラップ

【書類名】

図面

【図 1】

第 1 図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 非天然系有機化合物の生分解率を、特別な放射線対策を施すことなく安全で簡便かつ迅速に、しかも精度よく測定する方法を提供すること。

【解決手段】 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体¹⁴Cの濃度を測定し、該¹⁴C濃度と現代炭素における¹⁴C濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定する。培地中の鉄などの金属を内部標準に使用することもできる。

【選択図】 図 1

願2002-366721

出願人履歴情報

識別番号 [000183657]

1. 変更年月日 2000年 6月30日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都墨田区横網一丁目6番1号
氏 名 出光石油化学株式会社